

(Translation of Citation 3 )

Patent Public Disclosure No. 271216/86

Laid open on December 1, 1986

**Patent Application No. 113824/85**

Filing Date: May 27, 1985

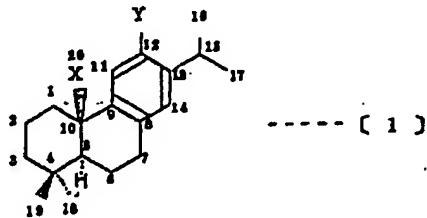
Applicant: Mitsubishi Kasei Kogyo Kabushiki Kaisha Tokyo, Japan

**Title of Invention**

## An anti-tumor agent

**Claim:**

## An anti-tumor agent comprising as an active ingredient diterpene of the formula



wherein X is hydroxymethyl, formyl, acetoxyethyl, methoxymethyl, alkyl or carboxyl; Y is hydroxyl or acyloxy; with the proviso that when X is carboxyl Y is acyloxy.

10118

## CITATION 3

⑩日本国特許庁(JP)

⑪特許出願公開

## ⑫公開特許公報(A) 昭61-271216

⑬Int.Cl.<sup>4</sup>A 61 K 31/05  
31/075  
31/11  
31/19

識別記号

ADU

序内整理番号

7330-4C  
7330-4C  
7330-4C  
7330-4C

⑭公開 昭和61年(1986)12月1日

7330-4C※審査請求 未請求 発明の数 1 (全6頁)

⑮発明の名称 抗腫瘍剤

⑯特 願 昭60-113824

⑰出 願 昭60(1985)5月27日

⑱発明者 西野 親生 町田市南大谷字11号916番地の2 株式会社三菱化成生命科学研究所内

⑲発明者 小林 孝次 町田市南大谷字11号916番地の2 株式会社三菱化成生命科学研究所内

⑳発明者 佐藤 茂 横浜市緑区鶴志田町1000番地 三菱化成工業株式会社総合研究所内

㉑発明者 大矢 淳一 横浜市緑区鶴志田町1000番地 三菱化成工業株式会社総合研究所内

㉒出願人 三菱化成工業株式会社 東京都千代田区丸の内2丁目5番2号

㉓代理人 弁理士 長谷川 一 外1名

最終頁に続く

## 明細書

## J 発明の詳細な説明

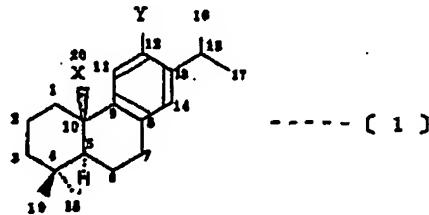
(産業上の利用分野)

本発明は抗腫瘍剤に関する。

(発明の構成)

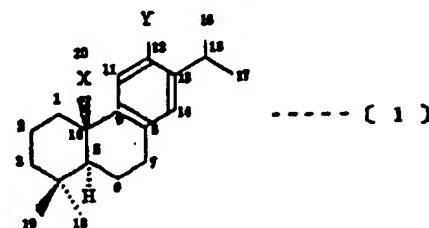
本発明者等は種々の植物中に含まれる生理活性物質を探索し、それらの薬効について検討中のところ、さきに、ヒノキ科の植物であるシノブヒバ中に存在するビシフェリン酸およびそのアルキル誘導体が抗腫瘍作用を示すことを知つた。本発明者等は上記の知見に基づいて更に研究の結果、上記物質以外の種々のビシフェリン誘導体が類似の効果を示すことを知り本発明を完成したものである。

すなわち、本発明の要旨は、〔1〕式



(式中Xはヒドロキシメチル基、ホルミル基、アセトキシメチル基、メトキシメチル基、アルキル基又はカルボキシル基を示し、Yはヒドロキシル基又はアシロキシ基を示す。ただし、Xがカルボキシル基のときYはアシロキシ基を示す。)

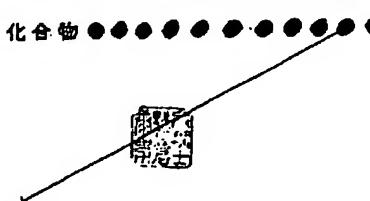
で表わされるジテルペンを有効成分とする抗腫瘍剤。



(式中Xはヒドロキシメチル基、ホルミル基、アセトキシメチル基、メトキシメチル基、アルキル基又はカルボキシル基を示し、Yはヒドロキシル基又はアシロキシ基を示す。ただし、Xがカルボキシル基のときYはアシロキシ基を示す。)

で表わされるジテルペンを有効成分とする抗腫瘍剤に存する。

本発明を詳細に説明するに、本発明の有効成分であるジテルベンとしては、前記〔1〕式におけるXが、ヒドロキシメチル基、アルデヒド基、アセトキシメチル基、メトキシメチル基、C数が1～10特に1～6のアルキル基又はカルボキシル基であり、また、Yがヒドロキシル基又はアシロキシ基〔-OCOR (RはC数が1～10特に1～6のアルキル基)〕である種々のジテルベン化合物を含む。



ヒドロキシル基をテトラヒドロピラニル基で保護した後、還元してメトキシカルボニル基をヒドロキシメチル基に変え（中間体）、次いで無水酢酸でアセチル化してヒドロキシメチル基をアセトキシメチル基に変えた後、テトラヒドロピラニル基を加水分解することによって製造される。

また、〔1〕式においてXがメトキシメチル基で、Yがヒドロキシル基の化合物5は、化合物4製造時の前記中間体のヒドロキシメチル基をヨウ化メチルでメチル化した後、テトラヒドロピラニル基を加水分解することによって得られる。

更に、前記〔1〕式において、Xがアルキル基で、Yがヒドロキシル基の化合物8～10は、前記化合物2のヒドロキシル基をテトラヒドロピラニル基で保護した後、アルキルトリフェニルホスホニウムプロマイド又はイオダイド（アルキルイオダイドとトリフェニルホスフィンから得られる）と反応〔ビティッヒ（Vitrig）反応〕させ、得られた縮合物のテトラヒドロピラニル基を除去した後、接触還元（Pd・C触媒使用）することによ

が挙げられる。なお、Xがカルボキシル基のときYはアシロキシ基のみを示す。

これらの化合物は、例えば、次のようにして製造される。

即ち、後記実施例に記載するように、前記〔1〕式において、Xがヒドロキシメチル基で、Yがヒドロキシル基の化合物1は、Xがメトキシカルボニル基で、Yがヒドロキシル基であるメチルビシフェレートを、リチウムアルミニウムハイドライドのような還元剤で還元することにより得られる。また、〔1〕式において、Xが~~メトキシカルボニル~~基でYがヒドロキシル基の化合物2は、化合物1をヨウ素( Jones )試薬で酸化して製造される。

また、[1]式において、Xがメチル基で、Yがヒドロキシル基の化合物3は、化合物2に無水ヒドラジンを反応させた後、苛性カリで還元することによって得られる。

更に、[1]式において、Xがアセトキシメチル基で、Yがヒドロキシル基の化合物4は、メチルビシフェレートにジヒドロビランを反応させて

って製造される。

なお、[1]式におけるYがアシロキシ基である化合物11～18は、Xがヒドロキシメチル基である場合（化合物11）を除き、Yがヒドロキシル基である相当する化合物を、夫々無水酢酸、無水プロピオン酸等の無水防腐剤カルボン酸でシリ化することにより得られる。

Xがヒドロキシメチル基で、Yがアセトキシ基の場合（化合物11）には、前記化合物2のヒドロキシル基をアセチル化した後、~~—CH<sub>2</sub>—~~基をヒドロキシメチル基に還元すればよい。

(発明の効果)

これらのジテルベンは、後記実施例に示すように、ヒーラ(HeLa)細胞(ヒト子宮頸癌組織から分離された細胞株)に対し優れた細胞増殖阻止作用を示し、抗腫瘍剤として有用である。

抗腫瘍剤として用いる場合、静脈内注射、皮下注射、経口カプセル等の方法で投与され、投与量は、成人に対し、水溶剤（注射）では、5～100 mg/kg 体重、経口剤では、20～500 mg/kg 体重の

範囲である。注射、点滴用製剤とともに、単位投与量アンプルあるいは添加防腐剤と共に多投与量容器中に提供される。この製剤は、懸濁液、溶液、油性又は水性ヒヒクル中の乳液のような形態であってよく、ゲルコース、ゼラチンのような懸濁液、レシチン、リノール酸のような安定化剤、アーモンド油、ココナット油のような非水性ヒヒクル、ヨーヒドロキシ安息香酸メチルのような防腐剤を含んでいてもよい。

本発明の抗腫瘍剤を経口投与製剤とするには、カプセルのような器具からの吸収に好適な形態で提供されることが好ましい。カプセルでは、ゼラチンのような結合剤、乳糖のような賦形剤、ステアリン酸マグネシウムのような安定剤、馬鈴薯澱粉のような崩壊剤を含有させることができる。また、シクロデキストリンのような包接剤による包接化合物とし、更に該包接化合物をアクリル酸メチル・メタアクリル酸共重合体のような可溶性皮膜形成物質を用いて皮膜を施すことができる。製剤化の方法は、注射、点滴用製剤、経口投与用製

剤のいずれの場合においても常法でよい。

#### (実施例)

以下本発明を実施例について更に詳細に説明する。

#### ヒーラ細胞増殖抑制試験

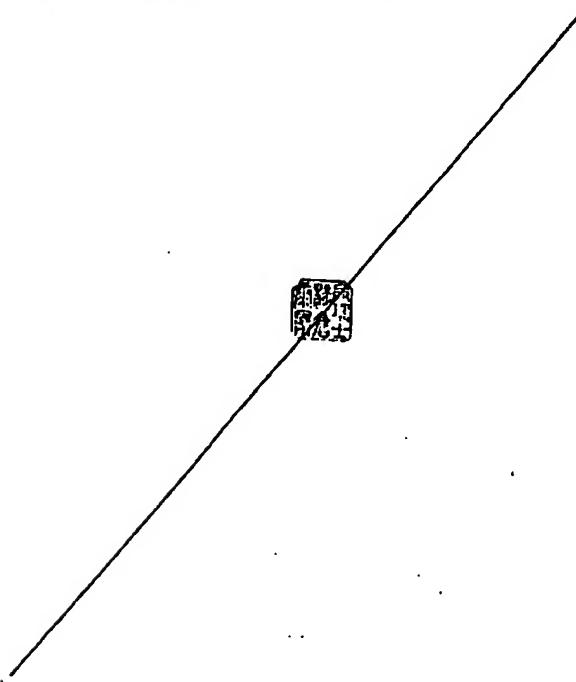
下記の表1に示す試料化合物をジメチルスルホキシドに溶解し、これを5%仔牛血清を加えたイーグルMEM培地で所定濃度に希釈し、96穴のマイクロプレートに100μl/穴で分注した。

これに、 $1 \times 10^5$ 個/mlに調製したヒト子宮癌細胞由来のヒーラ細胞の浮遊液を100μl/穴加えた。

これを炭酸ガス雰囲気下、37°Cで4日間培養した後ゲンチアナバイオレット染色液でマイクロプレートの底に付着増殖したヒーラ細胞を染色した。水で過剰の染色液を洗浄後、染色されたヒーラ細胞の色素をエタノール(100μl/穴)で溶出し、その濃度を分光光度計で測定した。

細胞数と染色された色素の量は比例するので、上記で測定した試料の各濃度に対する色素濃度を

プロットし、このグラフから対照(試料化合物が無い場合)におけるヒーラ細胞の数(100%とする)の50%に相当する試料化合物の濃度をED<sub>50</sub>として求めた。その結果を表1に示した。



	試料化合物			ED <sub>50</sub> (μg/ml)
		X	Y	
実施例 1	化合物 1	CH <sub>3</sub> OH	OH	10.9
# 2	化合物 2	CHO	OH	5.8
# 3	化合物 3	CH <sub>3</sub>	OH	5.5
# 4	化合物 4	CH <sub>3</sub> OOCCH <sub>3</sub>	OH	1.6
# 5	化合物 5	CH <sub>3</sub> OCH <sub>3</sub>	OH	8.0
# 6	化合物 6	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	OH	3.6
# 7	化合物 7	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	OH	2.9
# 8	化合物 8	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	OH	3.4
# 9	化合物 9	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	OH	5.9
# 10	化合物10	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	OH	4.7
# 11	化合物11	CH <sub>3</sub> OH	OOCCH <sub>3</sub>	8.2
# 12	化合物12	CHO	OOCCH <sub>3</sub>	5.8
# 13	化合物13	CH <sub>3</sub> OOCCH <sub>3</sub>	OOCCH <sub>3</sub>	4.9
# 14	化合物14	CH <sub>3</sub> OCH <sub>3</sub>	OOCCH <sub>3</sub>	10.6
# 15	化合物15	CH <sub>3</sub>	OOCCH <sub>3</sub>	6.0
# 16	化合物16	COOH	OOCCH <sub>3</sub>	7.7
# 17	化合物17	COOH	OOCCH <sub>3</sub>	7.0
# 18	化合物18	COOH	OOCCH <sub>3</sub>	3.8
# 19	化合物19	COOH	OOCCH <sub>3</sub>	2.7

参考のため上記実施例に用いた化合物の製法を以下に示す。

## 【製造例】

## 化合物1の製造

アルゴン気流中で、無水エーテル 10 ml にリチウムアルミニウムハイドライド 127 mg を懸濁させ、これにメチルビシフェレート 276 mg の無水エーテル溶液 5 ml を 0°C で滴加した。室温で 20 時間攪拌した後、少量の水を加えて過剰の試薬を分解した。反応液をエーテル中に注入し、飽和食塩水で洗浄後、硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下濃縮した。得られた残渣を分取薄相クロマトグラフィー( n-ヘキサン : アセトン = 85 : 15 ) に付して、22 mg の化合物 2 を得た。

## 化合物2の製造

35 mg の上記化合物 1 をアセトン 1 ml に溶解し、0°C でジョーンズ試薬 2 滴を加えて数回攪拌した。反応液を飽和食塩水中に注入し、クロロホルムで抽出した。クロロホルム層を飽和食塩水で

ビリジニウム p-トルエンスルフォネート 13.6 mg を加え、室温で 8 時間攪拌した。反応液をエーテル中に注入し、飽和食塩水で洗浄した後、硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下濃縮した。

得られた残渣 225 mg を無水エーテル 3 ml に溶解した溶液を、アルゴン気流中、0°C でリチウムアルミニウムハイドライド 83 mg の無水エーテル懸濁液 5 ml 中に滴加し、室温で 13 時間攪拌した。少量の水を加えて過剰の試薬を分解した後、反応液をエーテル中に注入し、飽和食塩水で洗浄後、硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下濃縮した。得られた残渣を分取薄相クロマトグラフィー( n-ヘキサン : アセトン = 75 : 25 ) に付して 210 mg の化合物 ([1] 式に於いて、X がヒドロキシメチル基で、Y がテトラヒドロピラニロオキシ基の化合物) を得た。

上記収得した化合物 54 mg に、ビリジン 0.5 ml 及び無水酢酸 0.5 ml を加え、室温で 15 時間放置した後、反応液を氷水中に注入し、クロロホルムで抽出した。クロロホルム層を 5% 塩酸、5

洗浄後、硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下濃縮した。得られた残渣を分取薄相クロマトグラフィー( n-ヘキサン : アセトン = 85 : 15 ) に付して、22 mg の化合物 2 を得た。

## 化合物3の製造

140 mg の上記化合物 2 に、トリエチレングリコール 5 ml、無水ヒドラジン 2.4 ml、ヒドラジン二塩酸塩 500 mg を加え、140°C で 14 時間攪拌した。反応液を室温まで冷却した後、苛性カリ顆粒 2.6 g を加えて 150°C で 2 時間、150 ~ 200°C で 2 時間、更に 210°C で 3 時間攪拌した。反応液を飽和食塩水中に注入し、n-ヘキサンで抽出し、n-ヘキサン層を硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下濃縮した。得られた残渣を分取薄相クロマトグラフィー( n-ヘキサン : アセトン = 8 : 1 ) に付して、103 mg の化合物 3 を得た。

## 化合物4の製造

メチルビシフェレート 180 mg の無水塩化メチレン溶液 5 ml に、ジヒドロビラン 200 mg 及び

炭酸水素ナトリウム及び飽和食塩水で順次洗浄後、硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下濃縮した。得られた残渣 80 mg をエタノール 2 ml に溶解し、ビリジニウム p-トルエンスルフォネート 4 mg を加え、55°C で 3 時間攪拌した。反応液を減圧下濃縮して得た残渣を分取薄相クロマトグラフィー( n-ヘキサン : アセトン = 85 : 15 ) に付して 47 mg の化合物 4 を得た。

## 化合物5の製造

水素化ナトリウム 20 mg を含む 5 ml の無水テトラヒドロフラン懸濁液に、アルゴン気流中 45°C でヨウ化メチル 191 mg を加え、次いでこれに、前記化合物 3 製造の中間体である、[1] 式における X がヒドロキシメチル基で Y がテトラヒドロピラニロオキシ基の化合物 104 mg を含む無水テトラヒドロフラン 3 ml の溶液を滴加した。45°C で 12 時間攪拌後、水で過剰の試薬を分解し、水中に注入し、クロロホルムで抽出した。

クロロホルム層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下濃縮し、残渣を分

取締層クロマトグラフィー（n-ヘキサン：アセトン = 9 : 1）に付して 48 mg の X がメトキシメチル基で Y がヒドロキシル基の化合物を得た。

#### 化合物 7 の製造

84 mg のエチルトリフェニルホスホニウムプロマイドを 1.5 ml の無水テトラヒドロフランに懸濁させ、アルゴン気流下、-25°C で n-アブチルリチウムのヘキサン溶液 (1.6 M) を 155 μl 加えた。

次いで、室温で 30 分間攪拌した後、前記化合物 2 のヒドロキシル基をテトラヒドロピラニル基で保護した化合物 58 mg の無水テトラヒドロフラン溶液 1.5 ml を -25°C で加え、室温で 4 時間攪拌した後、反応液を飽和食塩水中に注ぎエーテルで抽出した。エーテル抽出液を飽和食塩水で洗浄後、硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下濃縮した。得られた残渣を、分取薄層クロマトグラフィー（n-ヘキサン：アセトン = 98:2）に付し、化合物 50 mg を得た。この化合物を 1 ml のエタノールに溶かし、ビリジニウム p-トルエンスル

フォネット 3 mg を加え、55°C で 3 時間攪拌した。反応液を濃縮後、残渣を分取薄層クロマトグラフィー（n-ヘキサン：アセトン = 95:5）に付して得られた化合物 36 mg を酢酸エチルエステル 1.5 ml に溶かし、20 mg の 10 % Pd-C を加え、室温で水素気流下 12 時間攪拌した。触媒を吸引除去した後、濾液を減圧下濃縮して得られた残渣を分取薄層クロマトグラフィー（n-ヘキサン：アセトン = 9 : 1）に付し、37 mg の化合物 7 を得た。

なお、化合物 8 及び化合物 8 ~ 10 も上記と同様の方法で得られた。

#### 化合物 19 の製造

32 mg のビシフェリン酸を 0.15 ml の無水ビリシンに溶かし、28 μl の無水吉草酸を加えて室温で 4 時間放置した後、反応液を氷水中に注ぎ、クロロホルムで抽出した。クロロホルム層を 5 % 塩酸、5 % 炭酸水素ナトリウム及び飽和食塩水で順次洗浄した後、硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下濃縮した。得られた残渣を分取薄層クロマトグ

ラフィー（n-ヘキサン：アセトン = 9 : 1）に付し 24 mg の化合物 19 を得た。

なお、化合物 12 ~ 18 も上記と同様の方法で得られた。

#### 化合物 11 の製造

化合物 12（前記 [1] の X が ~~メトキシ~~ 基で、Y がアセトキシ基の化合物）25 mg を 1 ml のエタノールに溶かし、0 °C で 2.8 mg の水素化ホウ素ナトリウムを加え 1 時間攪拌し、反応液をメタノール性希釈酢酸で中和した後、飽和食塩水中に注ぎ、クロロホルムで抽出した。クロロホルム層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸マグネシウムで乾燥し減圧下濃縮し、残渣を分取薄層クロマトグラフィー（n-ヘキサン：アセトン = 8 : 2）に付し、23 mg の化合物 11 を得た。

出願人 三菱化成工業株式会社

代理人 弁理士 長谷川 一

様 1 名

第1頁の続き

@Int.Cl.

識別記号

庁内整理番号

// C 07 C 39/12  
43/178  
47/36  
47/37  
69/017  
69/16

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**